

**LAPORAN TAHUNAN
HIBAH BERSAING**



**MATURASI OOSIT DAN FERTILISASI *IN VITRO*
MENGUNAKAN KULTUR SEL GRANULOSA
FOLIKEL OVARIUM**

Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun

Ketua/Anggota Peneliti:

Dr. drh. Heru Nurcahyo, M.Kes
Ir. Ciptono, M.Si

NIDN: 0014046205
NIDN: 0015116206

**UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA
November, 2013**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian:

”Maturasi Oosit dan Fertilisasi *In Vitro* Menggunakan Kultur Sel Granulosa Folikel Ovarium”

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : Dr. drh. Heru Nurcahyo, M.Kes.
NIDN : 0014046205
Jabatan fungsional : Lektor Kepala (750)
Program Studi : Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA
Nomor HP. : 08164226257
Alamat Surel : h.nurcahyo@yahoo.com
Anggota (1) : Ir. Ciptono, M.P
NIDN : 0015116206
Jabatan fungsional : Lektor (300)
Program Studi : Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA
Nomor HP. : 08122770610
Alamat Surel : ciptono@uny.ac.id.
Institusi Mitra : FK UGM Yogyakarta
Alamat : Jl. Farmako, Sekip Utara, Yogyakarta 55281
Penanggung Jawab : LPPM UNY
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 40.000.000,- (Empat puluh juta rupiah)
Biaya Keseluruhan : Rp 100.000.000,- (Seratus juta rupiah)

Mengetahui,
Dekan FMIPA UNY

Yogyakarta, 20 November 2013
Ketua Peneliti

Dr. Hartono
NIP. 19620329 198702 1 002

Dr. drh. Heru Nurcahyo, M.Kes
NIP. 19620414 198803 1 003

Menyetujui
Ketua Lembaga Penelitian UNY

Prof. Dr. Anik Ghufon
NIP. 19621111 198803 1 001

RINGKASAN

MATURASI OOSIT DAN FERTILISASI *IN VITRO* MENGGUNAKAN KULTUR SEL GRANULOSA FOLIKEL OVARIUM

Oleh: Heru Nurcahyo & Ciptono

Abstrak

Target khusus yang ingin dicapai dari hasil penelitian tahun pertama ini adalah membuktikan bahwa kultur sel granulosa folikel ovarium domba dapat digunakan sebagai medium untuk maturasi oosit domba dengan parameter oosit domba dapat berkembang dengan baik dengan persentase oosit yang mengalami pembentukan kumulus ooforus sempurna mencapai 75 %. Tujuan jangka panjang dari penelitian ini adalah menemukan metode baru pematangan oosit dan medium untuk pelaksanaan metode fertilisasi *in vitro* (IVF).

Metode yang dipakai dalam pencapaian tujuan tersebut menggunakan metode penelitian eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran UGM Yogyakarta. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah oosit dari folikel *immature* domba dengan ukuran diameter 1-2 mm yang dikelompokkan menjadi 1 kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan dengan ulangan masing-masing 50 oosit. Kelompok kontrol terdiri dari oosit yang dimaturasi dalam medium MEM, sedangkan kelompok perlakuan terdiri dari oosit yang dimaturasi dalam kultur sel granulosa folikel ovarium domba. Perlakuan dilakukan pada suhu 37 °C dalam inkubator 5% CO₂ 95% O₂. Kematangan oosit dinilai dari tingkat ekspansi sel-sel kumulus dalam membentuk kumulus ooforus. Data yang diperoleh di analisis dengan menggunakan analisis deskriptif kualitatif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa oosit *immature* yang diaspirasi dari folikel ovarium domba dapat mengalami pematangan secara *in vitro* pada kultur sel granulosa (KSG) folikel ovarium domba, maka dapat diambil suatu kesimpulan bahwa KSG dapat digunakan sebagai medium untuk memelihara dan mematangkan oosit domba *immature*.

Kata kunci: Oosit, maturasi *in vitro*, dan kultur sel granulosa

OOSIT MATURATION *IN VITRO* ON LAMB GRANULOSA CELLS CULTURE

By:

Heru Nurcahyo & Ciptono

Department of Biology Education, Faculty of Math and Sciences,
State University of Yogyakarta. Email: h.nurcahyo@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the lamb oocytes maturation in vitro on cultured lamb granulosa cell (LGC).

This experimental researches were conducted in the cell culture laboratory of Department of Biology Education of FMIPA UNY and Ilmu Faal Laboratory of Medicine Faculty of UGM Yogyakarta. Lamb ovaries were collected from a local slaughter house in Yogyakarta, and transported to the laboratory in Phosphate Buffered Saline (PBS). Immature oocytes were aspirated from follicles with 1-2 mm diameters by needle 18 G. Oocytes in vitro maturation (MIV) was performed in the MEM, LGC then incubated at 37°C with 5% CO₂ for 24-72 hours. Evaluation of oocytes maturation was determined by development of cumulus cells by morphological appearance of the cumulus cells under inverted microscope. This research is randomized control design with 1 control group and 2 treatments groups as follow: MEM, and LGC.

The overall results showed that lamb oocytes were capable development in vitro on LGC, and MEM. LGC had significantly higher potential of developing lamb oocytes.

Keywords: *oocytes maturation, cultured lamb granulosa cell (LGC), in vitro.*

A. Latar Belakang

Teknologi di bidang biologi reproduksi kini telah berkembang dengan pesat. Berbagai penelitian yang dikembangkan di bidang ini telah membuahkan hasil yang mengagumkan, salah satunya adalah suatu teknik yang disebut dengan Fertilisasi *in vitro* (FIV). Fertilisasi *in vitro* ini dapat digunakan untuk mengatasi masalah infertilitas dan meningkatkan kualitas hewan ternak serta konservasi hewan langka (Riddle, 2002: 2). Sperma yang sehat dan sel telur masak siap dibuahi dibutuhkan dalam pelaksanaan teknik FIV ini. Selain itu, dalam pelaksanaan FIV juga diperlukan peralatan dan medium yang sesuai untuk memfasilitasi terjadinya proses pembuahan. Sperma sehat dapat dipilih dengan cara melakukan *swim up* sperma motil dalam tabung reaksi, dan sel telur masak dapat diperoleh dari superovulasi atau dari pematangan oosit *immature* dalam medium maturasi yang sesuai. Oosit *immature* pada hewan dapat diperoleh dari folikel ovarium hewan ternak betina yang disembelih di Rumah Potong Hewan (RPH) yang kemudian dimatangkan secara *in vitro* agar menjadi sel telur yang siap dibuahi.

Kultur sel granulosa sebagai suatu sistem hidup memiliki keunikan dan kelebihan antara lain: dapat memproduksi berbagai zat metabolit yang sangat sulit dibuat secara sintetik karena komposisinya yang rumit seperti berbagai macam hormon terutama estrogen (E₂) yang berguna untuk merangsang

pertumbuhan sel telur, dan berbagai faktor pertumbuhan. Selain itu, sel granulosa juga memiliki andil yang menentukan karena memberikan suasana lingkungan linternal yang unik dan spesifik untuk pertumbuhan dan perkembangan sel telur selama di dalam folikel ovarium (Maruo, *et al.*, 1995).

B. Tinjauan Pustaka: Maturasi Oosit

Maturasi oosit didefinisikan sebagai permulaan dan penyelesaian pembelahan meiosis pertama dari tahap *germinal vesicle* sampai pada tahap metafase II, yang diikuti oleh maturasi sitoplasma yang diperlukan untuk fertilisasi dan perkembangan awal embrio. Maturasi nukleus berhubungan dengan pembelahan meiosis sampai pada tahap metafase II. Sedangkan maturasi sitoplasma berhubungan dengan persiapan sitoplasma oosit untuk fertilisasi dan perkembangan embrio (Chian *et al.*, 2003). Maturasi oosit terdiri dari dua periode yaitu periode pertumbuhan dan persiapan akhir nukleus dan sitoplasma sebagai prasyarat untuk terjadi fertilisasi dan perkembangan embrio secara normal (Hafez, 1993). Pematangan nukleus diawali dari pecahnya membran nukleus (*germinal vesicle breakdown*, GVBD), hilangnya nukleoli dan kondensasi kromosom (Gordon, 1994). *Germinal vesicle breakdown*, menyebabkan pelepasan beberapa faktor nukleus, dan merangsang beberapa perubahan sitoplasma untuk perkembangan pronukleus jantan setelah penetrasi oosit oleh spermatozoa (Vaderhyden & Armstrong, 1989). Oosit primer akan mengalami dua kali pembelahan setelah GVBD, pembelahan meiosis pertama menghasilkan oosit sekunder dan benda kutub pertama yang tampak di dalam ruang perivitelina. Jumlah kromosom oosit berubah dari diploid ($2n$) menjadi haploid ($1n$). Pembelahan ini selesai sebelum terjadinya ovulasi. Pembelahan meiosis kedua dimulai segera setelah pembelahan meiosis pertama selesai dan tetap berlangsung sebelum terjadinya fertilisasi oosit oleh spermatozoa (Bearden & Fuquay, 1980). Oosit yang dimatursasi secara *in vitro* akan mengalami pembelahan meiosis pertama, dimulai dari stadium *dictyate* fase profase pembelahan meiosis pertama sampai metafase I atau II seperti stadium yang dicapai pada saat ovulasi alami (Hafez, 1993).

Keberadaan serum dalam medium *in vitro* penting untuk maturasi oosit. Serum sapi estrus dan serum sapi proestrus yang ditambahkan dalam medium untuk maturasi oosit secara *in vitro* dapat menghasilkan oosit masak, persentase fertilisasi oleh spermatozoa lebih tinggi (Younis *et al.*, 1989). Hormon, *growth factor*, dan beberapa faktor lain yang terdapat dalam serum memainkan peran penting dalam maturasi oosit (Kato & Iritani, 1993). Faktor-faktor tersebut diperlukan oleh kompleks kumulus oosit dan dapat mencegah terjadinya pengerasan zona pellusida sehingga meningkatkan penembusan oosit oleh spermatozoa dan meningkatkan jumlah oosit yang berkembang menjadi blastosis *in vitro* (Budiono & Suzuki, 1996).

C. Tujuan dan Manfaat Penelitian

Penelitian ini secara khusus bertujuan untuk mengkaji perkembangan oosit domba pada kultur sel granulosa folikel ovarium domba *in vitro*.

D. Metode Penelitian

Penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap (RAL) ini terdiri atas 1 kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan, masing-masing terdiri dari 50 ulangan. Kelompok tersebut adalah:

Kelompok kontrol : oosit *immature* + MEM

Kelompok perlakuan : oosit *immature* + KSG + FBS 5%

Kelompok perlakuan : oosit *immature* + KSG + FBS 10%

Penelitian dilakukan di Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran UGM. Subyek penelitian ini adalah kultur sel granulosa (KSG), dan obyek penelitian ini adalah oosit domba. Variabel bebas adalah jenis medium maturasi, yaitu MEM, dan KSG dengan variasi penambahan serum (FBS). Variabel tergayut adalah tingkat perkembangan/ekspansi sel kumulus.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Laminar air flow*, *autoclave*, sentrifuse, inkubator 95% oksigen dan 5% karbondioksida, *vortex (mixer)*, *inverted microscope*, *fotomicrograph*. Bahan yang digunakan antara lain; MEM (*Minimal Essential Medium*), serum fetus sapi, *pennicilin-streptomycin*, dan *fungizone*, *multiwells plate* 96 sumuran.

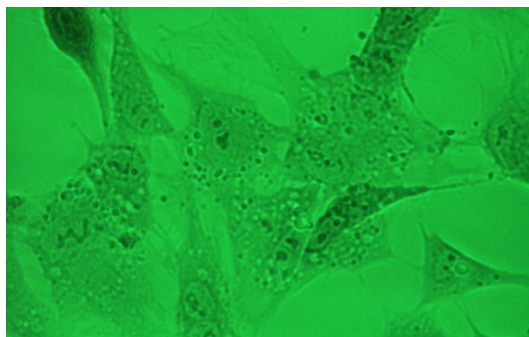
Prosedur pembuatan KSG; ovarium diperoleh dari domba betina berumur 1-2 tahun yang dipotong di RPH. Oosit yang belum matang (*immature*) diambil dari folikel berukuran 1-2 mm dengan cara aspirasi menggunakan jarum spuit 18 G. Cairan folikel dimasukkan ke dalam tabung konikal dan ditambahkan 10 ml larutan MEM kemudian disentrifus dengan 5000 rpm selama 5 menit diambil bagian pelet. Kualitas oosit diklasifikasikan berdasarkan kekompakan dan banyaknya sel folikel. Pelet pada tabung sentrifuse di *vortex* selama 1 menit kemudian dimasukkan ke dalam 96 sumuran *multiwells plate* sebanyak 50 μ l. *Multiwell plate* dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C dan diamati tingkat maturasi dan kerusakan tiap 24 jam selama 3 kali 24 jam. Oosit yang dipakai adalah yang termasuk dalam kualitas A (Madison *et al.*, 1992). Evaluasi oosit berdasarkan tungkat ekspansi cumulus ooforus dibawah *inverted microscope* dengan pembesaran 200x menjadi tiga tingkat yaitu: (0) tidak ada ekspansi sel cumulus; (1) sel kumulus terekspansi sebagian, dan (2) jika sel kumulus terekspansi secara sempurna.

Data hasil pengamatan yang diperoleh di analisis dengan menggunakan metode deskriptif kualitatif dan kuantitatif. Jika terdapat perbedaan bermakna dilanjutkan dengan uji beda rerata *Duncan Multiple Range Test (DMRT)* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pengaruh antarperlakuan. Perbedaan dianggap signifikan apabila nilai $P < 0,05$.

E. Hasil dan Pembahasan

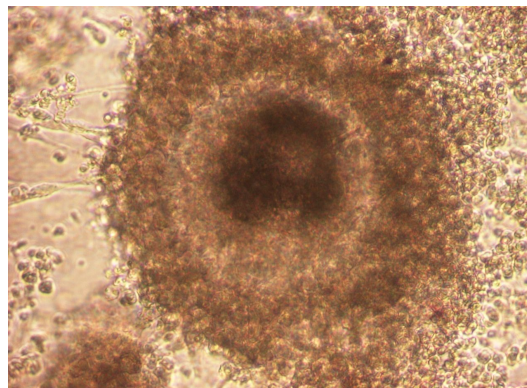
1. Hasil Penelitian

Hasil pengamatan sel granulosa yang diaspirasi dari folikel ovarium domba setelah ditanam dalam medium kultur dan diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5% dan udara 95% selama 72 jam menunjukkan bahwa pertumbuhan sel granulosa telah menyebar merata memenuhi permukaan dasar cawan kultur, sel satu dengan lainnya saling bersinggungan (konfluen).



Gambar 1. Foto mikroskopis kultur sel granulosa folikel ovarium domba pada kondisi konfluen setelah diinkubasi selama 72 jam (3 Hari) (Perbesaran 400 x).

Hasil pengamatan oosit yang diaspirasi dari ruang antral folikel ovarium domba (tahap folikel tersier) setelah dimaturasi pada KSG folikel ovarium domba menunjukkan bahwa oosit terlihat dikelilingi oleh corona radiata yang sempurna, menempel pada dasar sumuran dan belum nampak adanya ekspansi kumulus ooforus seperti pada gambar 2 berikut ini.



Gambar 2. Foto mikroskopis oosit domba setelah diinkubasi selama 72 Jam (3 Hari) (Perbesaran 400 x).

Hasil pengamatan ekspansi sel-sel kumulus pada medium MEM terhadap perkembangan corona radiata menunjukkan hasil terlihat adanya kenaikan jumlah sel yang menunjukkan adanya proliferasi sel. Pengaruh jenis medium terhadap tingkat perkembangan kumulus ooforus pada berbagai medium: MEM, dan Kultur Sel Granulosa (KSG) terhadap pertumbuhan corona radiata oosit dapat dilihat pada tabel 1 berikut.

Tabel 1. Tingkat Perkembangan kumulus ooforus pada berbagai medium: MEM, dan Kultur Sel Granulosa (KSG)

Jenis Medium	Jumlah Oosit	Tingkat Perkembangan			Keterangan
		0	1	2	
MEM	52	0,62	0,27	0,12	Sedang

KSG + FBS 5%	56	0,46	0,34	0,20	Baik
KSG + FBS 10%	55	0,25	0,47	0,27	Amat baik

Keterangan:

0. Tidak ada ekspansi sel-sel kumulus ooforus
1. Ekspansi sel-sel kumulus ooforus sebagian
2. Ekspansi sel-sel kumulus ooforus sempurna

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ekspansi sel-sel kumulus ooforus pada kelompok MEM paling sedikit, sedangkan pada KSG ekspansi sel-sel kumulus ooforus lebih intensif, namun demikian persentase ekspansi kumulus paling optimal dijumpai pada kelompok yang dimatangkan dengan medium KSG, yaitu sebesar 0.27%.

2. Pembahasan

Hasil pengamatan setelah inkubasi selama 24 jam menunjukkan bahwa ekspansi sel-sel kumulus ooforus pada kelompok MEM paling sedikit, sedangkan pada KSG ekspansi sel-sel kumulus ooforus lebih intensif, namun demikian persentase ekspansi kumulus paling optimal dijumpai pada kelompok yang dimatangkan dengan medium KSG + FBS 10%, yaitu sebesar 65.40%. Menurut Maddison *et al.* (1992), ekspansi sel-sel kumulus ooforus mulai terlihat pada masa inkubasi umur 48 jam (2 hari) yang ditandai oleh adanya kumulus ooforus. Secara *in vivo*, pertumbuhan oosit mulai terlihat pada masa inkubasi umur 48 jam (2 hari) yang ditandai oleh adanya corona radiata. Sel-sel granulosa lebih banyak tumbuh pada suatu tempat pada dinding folikel sehingga membentuk masa sel yang padat yang disebut kumulus ooforus yang mengandung oosit. Kumulus ooforus menonjol ke bagian dalam antrum folikuli setelah itu oosit tidak mengalami pertumbuhan lagi. Oosit melekat pada dinding folikel dengan perantara pedikel yang dibentuk oleh sel-sel granulosa. Karena sel granulosa tidak bertambah banyak sebanding dengan penimbunan cairan, maka lapisan sel granulosa menjadi lebih tipis. Sel-sel granulosa membentuk lapisan pertama yang meliputi oosit. Oosit tidak mengalami pertumbuhan lagi dan dikelilingi dengan zona pellucida yang membentuk corona radiata. Inti dalam status fase profase pembelahan meiosis pertama. Oosit dapat tumbuh dan berkembang secara *in vivo* karena rongga folikel menjadi lingkungan interna yang sesuai dan cocok selain mengandung berbagai substansi juga kondisi seperti suhu pH untuk pematangan oosit. KSG dapat mensintesis dan menskresikan berbagai substansi tertentu untuk pematangan oosit. Pada kelompok yang ditumbuhkan pada KSG terlihat terjadi peningkatan pertumbuhan sel kumulus ooforus. Peningkatan pertumbuhan sel kemungkinan disebabkan karena adanya substansi yang terkandung dalam KSG yang secara langsung yang berguna merangsang pertumbuhan sel. Medium yang baik adalah medium yang memberikan aktivitas metabolisme sel/jaringan secara maksimal sehingga meningkatkan daya tahan hidup sel/jaringan. Kualitas media ditentukan oleh pH, komposisi nutrien, dan suhu. Hal tersebut kemungkinan karena KSG mengandung komponen-komponen yang dibutuhkan dalam perkembangan oosit. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Heru Nurcahyo (1999), setelah beberapa saat ditanam pada medium kultur yang sesuai, maka sel hewan akan

mengalami adaptasi dan seleksi lebih lanjut yakni sel yang dapat beradaptasi dengan lingkungan kultur akan hidup dan mengalami proliferasi, beberapa sel dapat hidup tetapi tidak mampu berproliferasi, dan sebagian lainnya mengalami kematian. Sel-sel kumulus ooforus adalah sel-sel granulosa yang menempel pada oosit menonjol ke bagian dalam antrum folikuli setelah itu oosit tidak mengalami pertumbuhan lagi. Sel-sel kumulus berperan sangat penting dalam proses pematangan oosit dan berdasarkan tingkat ekspansinya dapat di evaluasi tingkat kematangannya. Maturasi sitoplasma oosit ditandai dengan terjadinya ekspansi sel kumulus yang berperan menciptakan lingkungan mikro oosit berupa peningkatan kebutuhan makanan oosit (Kennedy *et al.*, 1994). Peningkatan ekspansi sel-sel kumulus ooforus kemungkinan disebabkan karena adanya zat-zat yang dihasilkan oleh sel granulosa yang berguna memberikan aktivitas metabolisme sel/jaringan secara maksimal sehingga meningkatkan daya tahan hidup sel/jaringan dan merangsang pertumbuhan sel. Sel kumulus yang terdapat di sekeliling oosit dirangsang secara *in vitro* oleh LH dan estrogen yang terdapat dalam cairan folikel sehingga protein atau hormon dapat menghalangi aksi inhibitor folikular dan pemicu meiosis dibentuk dalam kumulus oosit kompleks. Menurut Heru Nurcahyo (2000), KSG menghasilkan hormon estrogen dan juga progesteron. Kualitas oosit sangat dipengaruhi oleh tingkat maturasi yang dihasilkan, seperti halnya yang dijelaskan oleh Gordon (1994) bahwa oosit dengan morfologi bagus yaitu kumulus berlapis-lapis, kompak, ooplasma homogen, penampilan COC terang dan transparan menghasilkan lebih banyak oosit *mature* setelah MIV.

H. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat diambil suatu kesimpulan bahwa KSG dapat digunakan sebagai medium untuk memelihara dan mematangkan oosit domba *immature* dengan sangat baik dibanding medium kultur (MEM).

E. Saran

Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kelayakan penggunaan kultur sel granulosa folikel ovarium sebagai medium pengembangan teknologi reproduksi seperti: IVF, cloning embryo, dan ternak transgenik.

PRAKATA

Puji syukur peneliti panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik sesuai rencana. Penelitian yang berjudul “Maturasi Oosit Secara *In Vitro* Menggunakan Kultur Sel Granulosa Folikel Ovarium Domba” ini dikerjakan di Laboratorium Jurdik Biologi FMIPA, UNY, dan Laboratorium Ilmu Faal, Fakultas Kedokteran, Universitas Gajah Mada (UGM).

Peneliti menyadari bahwa penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik karena adanya bantuan dari berbagai pihak, untuk itu ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya penulis tujukan kepada Yth.:

1. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) UNY sebagai pengelola penelitian Hibah Bersaing yang telah memberikan persetujuan dan pendanaan untuk dilaksanakannya penelitian ini.
2. Bapak Dekan, dan Ketua Jurusan Pendidikan Biologi, FMIPA, UNY yang telah memberikan ijin dilaksanakannya penelitian ini.
3. Kepala Laboratorium Ilmu Faal, Fakultas Kedokteran, UGM yang telah memberikan ijin untuk melaksanakan penelitian di laboratorium tersebut.
4. Prof. dr. Sri Kadarsih Soejono, M.Sc., Ph.D., yang telah memberikan arahan dalam pelaksanaan penelitian ini sekaligus telah meluangkan waktu untuk memberikan konsultasi dan bimbingan.
5. Semua pihak yang telah membantu terselesaikannya penelitian ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Tanpa bantuan mereka semua tentulah penelitian ini belum selesai. Semoga Tuhan membalas amal kebaikan mereka secara berlimpah-limpah. Akhir kata, tak ada gading yang tak retak. Apabila terdapat kesalahan atau kekurangan, peneliti mohon maaf dan saran yang sifatnya membangun. Harapan peneliti semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi yang memerlukannya.

Yogyakarta, 20 November 2013
Peneliti

DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR	xii
TABEL	
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Hasil yang telah Dicapai	4
B. Maturasi Oosit	8
1. Maturasi Nukleus	10
2. Maturasi Sitoplasma	11
3. Fertilisasi <i>in Vitro</i>	12
C. Medium Kultur	13
1. Minimal essential Medium (MEM)	15
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	17
BAB IV. METODE PENELITIAN	18
A. Jenis dan Desain Penelitian	18
B. Tempat dan Waktu Penelitian	18
C. Populasi dan Sampel Penelitian	18
D. Variabel Penelitian	18
E. Alat-alat dan Bahan Penelitian	18
F. Prosedur Penelitian	19
G. Analisis Data	20
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	21
A. Hasil Penelitian	21
1. Hasil Kultur Sel Granulosa Folikel Ovarium Babi	21
2. Perkembangan Oosit	22
B. Pembahasan	24
BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	30
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	32
A. Simpulan	32
B. Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	
Lampiran 1: Personalia Peneliti	35

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 1. Tingkat Perkembangan kumulus ooforus pada berbagai medium: MEM, KSG + FBS 5%, dan KSG + FBS 10%	23

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. Foto mikroskopis kultur sel granulosa folikel ovarium domba pada kondisi konfluen setelah diinkubasi selama 72 jam (3 Hari) (Perbesaran 400 x)	21
Gambar 2. Foto mikroskopis oosit domba setelah diinkubasi selama 24 jam (1 Hari) (Perbesaran 400 x)	22
Gambar 3. Foto mikroskopis oosit domba setelah diinkubasi selama 48 jam (2 Hari) (Perbesaran 400 x)	22
Gambar 4. Foto mikroskopis oosit domba setelah diinkubasi selama 72 jam (3 Hari) (Perbesaran 400 x)	23

BAB I PENDAHULUAN

F. Latar Belakang

Teknologi di bidang biologi reproduksi kini telah berkembang dengan pesat. Berbagai penelitian yang dikembangkan di bidang ini telah membuahkan hasil yang mengagumkan, salah satunya adalah suatu teknik yang disebut dengan Fertilisasi *in vitro* (FIV). Beberapa keuntungan yang dapat diperoleh dari teknik FIV ini adalah untuk mengatasi masalah infertilitas dan meningkatkan kualitas hewan ternak serta konservasi hewan langka (Riddle, 2002: 2). Pelaksanaan teknik FIV ini membutuhkan sel telur masak siap dibuahi dan sperma yang sehat. Selain itu, dalam pelaksanaan FIV juga diperlukan peralatan dan medium yang sesuai untuk memfasilitasi terjadinya proses pembuahan. Sperma sehat dapat dipilih dengan cara melakukan *swim up* sperma motil dalam tabung reaksi, DAN Sel telur masak dapat diperoleh dari superovulasi atau dari pematangan oosit *immature* dalam medium maturasi yang sesuai.

Oosit *immature* pada hewan dapat diperoleh dari folikel ovarium hewan ternak betina yang disembelih di Rumah Potong Hewan (RPH) yang kemudian dimatangkan secara *in vitro* agar menjadi sel telur yang siap dibuahi (Susilorini dkk., 2003: 54). Secara *in vivo*, oosit agar menjadi sel telur masak yang siap dibuahi, mengalami pertumbuhan dan perkembangan dalam folikel ovarium dari oosit primer. Sel-sel kumulus memiliki peranan yang sangat penting dalam proses pematangan oosit dan dengan tingkat ekspansinya dapat dievaluasi tingkat kematangannya. Selain itu, sel-sel kumulus juga berfungsi dalam pemasokan nutrisi bagi oosit melalui sistem *gap junction* (Nasich dkk., 2001: 132). Kultur sel granulosa sebagai suatu sistem hidup memiliki keunikan dan kelebihan antara lain: 1) dapat memproduksi berbagai zat metabolit yang sangat sulit dibuat secara sintetik karena komposisinya yang rumit. 2) dapat memproduksi berbagai macam hormon terutama estrogen (E_2) yang berguna untuk merangsang pertumbuhan sel telur, 3) dapat memproduksi berbagai faktor pertumbuhan. Selain itu, sel granulosa juga memiliki andil yang menentukan karena memberikan suasana lingkungan linternal yang unik dan spesifik untuk pertumbuhan dan perkembangan sel telur selama di dalam folikel ovarium (Maruo, *et al.*, 1995). Oleh karena itu, KSG sangat berguna untuk mengkaji pengaruh hormonal pada sel-sel ovarium secara langsung dan banyak digunakan oleh peneliti untuk mengkaji mekanisme kerja dan peran berbagai hormon dan faktor pertumbuhan dalam regulasi steroidogenesis dan pertumbuhan sel granulosa folikel ovarium secara langsung.

Penelitian ini menggunakan sampel oosit dan cairan folikel dari ovarium domba sebagai obyek penelitian, dengan pertimbangan folikel ovarium domba memiliki sifat dan fungsi yang mirip dengan folikel ovarium mamalia lainnya (Heru Nurcahyo, 2003: 8). Selain itu, domba merupakan hewan ternak yang dalam satu siklus estrus dapat mengovulasikan 4-5 ova (Sihombing, 1997: 117) dan ovarium domba berukuran cukup besar dengan panjang 1-2 cm sehingga memudahkan peneliti untuk mengambil sampel penelitian. Kultur sel primer pada kondisi konfluen, sel yang terdapat pada kultur tersebut menunjukkan morfologi dan fungsi yang spesifik yang sangat mirip dengan jaringan asalnya.

Estrogen ini menyebabkan sel-sel granulosa membentuk reseptor FSH yang semakin banyak, keadaan ini menyebabkan suatu umpan balik positif karena estrogen membuat sel-sel granulosa jauh lebih sensitif terhadap FSH yang disekresikan oleh kelenjar hipofisis anterior, sehingga proliferasi sel-sel granulosa dan sekresi cairan folikel meningkat (Guyton & Hall, 1996: 1286). Estrogen juga berperan dalam sintesis protein didalam sel telur (Hadley, 1992: 488). Selain itu, cairan folikel juga mengandung protein, proteoglikan, dan elektrolit (Yen & Jaffe, 1991: 196). *Epidermal Growth Factor* (EGF), yang juga terkandung di dalam cairan folikel, bersama-sama dengan gonadotropin berfungsi menginduksi ekspansi kumulus (pembentukan kumulus ooforus) dan mendukung maturasi inti dan sitoplasma pada oosit (Chian *et al.*, 2003: 156). Nutrisi dan hormon yang terkandung dalam cairan folikel tersebut memberikan lingkungan interna yang cocok untuk pertumbuhan oosit menjadi sel telur. Sehingga, cairan folikel dapat digunakan sebagai media pengganti dalam maturasi oosit *in vitro* jika serum dan hormon tidak tersedia (Nandi *et al.* 2004: 35).

Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Nasich dkk. (2001) dan Susilorini dkk. (2003) telah berhasil membuktikan bahwa cairan folikel dapat digunakan sebagai medium maturasi oosit secara *in vitro*. Hasil yang diperoleh dari kedua penelitian tersebut menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi cairan folikel yang ditambahkan ke dalam medium kultur maturasi oosit, maka tingkat kematangan dan jumlah oosit yang matang semakin meningkat. Susilorini dkk. (2003) menambahkan 2% dan 4% cairan folikel ovarium sapi ke dalam medium kultur maturasi oosit sapi, sedangkan Nasich dkk. (2001) menambahkan 5%, 10%, dan 15% cairan folikel ovarium kambing dalam medium kultur maturasi oosit kambing. Medium kultur yang digunakan sebagai medium maturasi oosit masih merupakan hasil impor dan mahal harganya, misalnya *Minimal Essential Medium* (MEM) dan *Tissue Culture Medium-199* (TCM-199). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan KSG folikel ovarium sebagai medium maturasi yang hasilnya akan dibandingkan dengan oosit yang dimaturasi dalam medium MEM. Jika hasil yang diperoleh dari cairan folikel dan MEM tidak berbeda signifikan, maka cairan folikel dapat diharapkan sebagai pengganti medium kultur yang masih diimpor dan mahal harganya.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka masalah yang dapat diidentifikasi adalah: Pematangan oosit *in vitro* dengan medium yang murah dan mudah didapat dengan memanfaatkan kultur sel granulosa folikel ovarium domba sebagai medium maturasi oosit domba secara *in vitro*.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Hasil telah Dicapai

Telah didapat bahwa sel granulosa folikel ovarium domba setelah ditumbuhkan pada cawan kultur dengan medium penumbuh yang mengandung 10 % serum (*fetal bovine serum*) dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% dan udara 95% selama 24 jam menunjukkan kemampuan beradaptasi, menempel pada dasar cawan kultur (*plating*), bertumbuh, dan berproliferasi (Heru Nurcahyo, 1999). Hasil pengamatan kultur sel granulosa folikel ovarium setelah inkubasi selama 72 jam, menunjukkan bahwa pertumbuhan sel granulosa telah menyebar merata memenuhi permukaan dasar cawan kultur, sel satu dengan lainnya saling bersinggungan, dan dapat mensekresikan estrogen dan progesteron (Heru Nurcahyo, 2002). Sel granulosa folikel ovarium memiliki beberapa keistimewaan antara lain: dapat memproduksi berbagai macam hormon terutama estrogen (E₂) yang bersifat sebagai autokrin, parakrin, dan atau hemokrin. Selama ini, penelitian tentang medium untuk fertilisasi *in vitro* pada umumnya mempergunakan medium buatan. Pada penelitian ini dipergunakan kultur sel granulosa folikel ovarium. Saat ini, dengan penguasaan dan dukungan kemajuan teknologi laboratorium sangat memungkinkan pembuatan kultur sel granulosa primer.

Menurut Bedetti & Cantafora (1990), beberapa kelebihan penggunaan kultur sel granulosa dibanding dengan jaringan utuh antara lain: 1) memiliki integritas morfologi dan biokimiawi dalam jangka waktu relatif lama sehingga memungkinkan untuk mengerjakan penelitian ulang dalam kondisi yang sama (*reproducible*) dan terkontrol, dan 2) pengambilan kesimpulan lebih mudah dan akurat karena menyangkut populasi sel granulosa yang homogen dan tanpa adanya pengaruh sistemik sehingga perubahan secara langsung akibat perlakuan dapat diamati. Meskipun demikian penggunaan kultur sel granulosa memiliki beberapa kekurangan antara lain: 1) dalam kasus kultur sel granulosa telah mengalami perubahan sifat aslinya, maka hasil pengamatan yang diperoleh akan menyimpang, dan 2) tidak terdapat pengaruh sistemik dan kerjasama antar sel berbeda dalam suatu jaringan yang memegang peran penting dalam aktivitas fisiologis secara sistemik.

Secara *in vivo*, oosit agar menjadi sel telur masak dan siap dibuahi, mengalami pertumbuhan dan perkembangan dalam folikel ovarium. Awalnya, oosit berada di dalam folikel primordial yang memiliki selapis sel epitel pipih yang mengelilingi oosit yang disebut sel granulosa. Kemudian folikel primordial dengan rangsangan dari *Follicle Stimulating Hormon* (FSH) yang disekresikan oleh pituitaria anterior tumbuh menjadi folikel primer yang ditandai dengan transformasi sel epitel pipih menjadi sel epitel kuboid selapis. Selanjutnya ukuran folikel primer dan jumlah sel granulosa semakin bertambah dan membentuk zona pelusida, selanjutnya folikel ini disebut folikel sekunder (Hadley, 1992: 477-478). Adanya rangsangan dari hormon FSH menyebabkan sel-sel granulosa berproliferasi dengan cepat sehingga ukuran folikel sekunder semakin membesar. Massa sel granulosa ini mensekresikan cairan folikuler yang mengandung estrogen dalam konsentrasi tinggi dan pengumpulan cairan ini menyebabkan munculnya antrum di dalam massa sel granulosa. Ketika antrum sudah terbentuk, sel granulosa berproliferasi lebih cepat dan laju sekresi cairan folikuler juga meningkat, folikel pada tahap ini disebut folikel antral (Guyton & Hall, 1996: 1268). Selanjutnya folikel antral berkembang menjadi folikel de Graff

yang ditandai dengan bertambahnya ukuran folikel dan meningkatnya sekresi cairan folikel ke dalam antrum. Di samping itu, di sekeliling oosit telah terbentuk dua atau tiga lapis sel granulosa yang disebut kumulus ooforus yang merupakan indikator kematangan oosit dan oosit siap diovulasikan (Yen & Jaffe, 1991: 196). Sel-sel kumulus ini memiliki peranan yang sangat penting dalam proses pematangan oosit dan dengan tingkat ekspansinya dapat dievaluasi tingkat kematangannya. Selain itu, sel-sel kumulus juga berfungsi dalam pemasokan nutrisi bagi oosit melalui sistem *gap junction* (Nasich dkk., 2001: 132).

Cairan folikel hasil sekresi sel granulosa yang terbentuk pada tahap folikel antral mengandung hormon estrogen dengan konsentrasi tinggi. Estrogen ini menyebabkan sel-sel granulosa membentuk reseptor FSH yang semakin banyak, keadaan ini menyebabkan suatu umpan balik positif karena estrogen membuat sel-sel granulosa jauh lebih sensitif terhadap FSH yang disekresikan oleh kelenjar hipofisis anterior, sehingga proliferasi sel-sel granulosa dan sekresi cairan folikel meningkat (Guyton & Hall, 1996: 1286). Estrogen juga berperan dalam sintesis protein didalam sel telur (Hadley, 1992: 488). Selain itu, cairan folikel juga mengandung protein, proteoglikan, dan elektrolit (Yen & Jaffe, 1991: 196). *Epidermal Growth Factor* (EGF), yang juga terkandung di dalam cairan folikel, bersama-sama dengan gonadotropin berfungsi menginduksi ekspansi kumulus (pembentukan kumulus ooforus) dan mendukung maturasi inti dan sitoplasma pada oosit (Chian *et al.*, 2003: 156). Nutrisi dan hormon yang terkandung dalam cairan folikel tersebut memberikan lingkungan interna yang cocok untuk pertumbuhan oosit menjadi sel telur. Sehingga, cairan folikel dapat digunakan sebagai media pengganti dalam maturasi oosit *in vitro* jika serum dan hormon tidak tersedia (Nandi *et al.* 2004: 35).

Oogonia mengalami beberapa kali pembelahan mitosis, dan dalam 6 minggu setelah fertilisasi, oogonia tersebut berpindah ke tepi germinal di korteks. Disini mereka melanjutkan pembelahan mitosis sampai fetus berumur 5 bulan, yang pada saat 5 bulan tersebut masing-masing ovarium memiliki 5-7 juta oogonia. Kurang lebih 1 juta oogonia kemudian diselimuti oleh sel folikuler, selanjutnya disebut dengan folikel primordial, dan hidup sampai pada saat kelahiran, sedangkan oogonia yang tidak terselimuti oleh sel folikuler kemudian mengalami atresia, berdegenerasi dan akhirnya mati. Oogonia yang hidup disebut oosit primer, dan sel ini memasuki tahap profase pada meiosis I. Meiosis kemudian tertahan sampai sesaat sebelum ovulasi dalam tahap diploten oleh suatu faktor parakrin yang disebut *meiosis-preventing substance* yang diproduksi oleh sel folikuler atau disebut juga sel granulosa. Satu juta oogonia tersebut kemudian berdegenerasi, dan pada saat *menarche* hanya tinggal 400.000 folikel primordial. Pada umumnya ovulasi terjadi 28 hari sekali selama 30-40 tahun dengan mengovulasikan 1 oosit tiap bulan, sehingga jumlah oosit total adalah 450, dan oosit yang lain mengalami degenerasi.

Secara fisiologis, maturasi oosit terdiri dari dua periode yaitu periode pertumbuhan dan persiapan akhir nukleus dan sitoplasma sebagai prasyarat untuk terjadi fertilisasi dan perkembangan embrio secara normal (Hafez, 1993). Pematangan nukleus diawali dari pecahnya membran nukleus (*germinal vesicle breakdown*, GVBD), hilangnya nukleoli dan kondensasi kromosom (Gordon, 1994). *Germinal vesicle breakdown*, menyebabkan pelepasan beberapa faktor nukleus, dan merangsang beberapa perubahan sitoplasma untuk perkembangan pronukleus jantan

setelah penetrasi oosit oleh spermatozoa (Vaderhyden & Armstrong, 1989). Oosit primer akan mengalami dua kali pembelahan setelah GVBD, pembelahan meiosis pertama menghasilkan oosit sekunder dan benda kutub pertama yang tampak di dalam ruang perivitelina. Jumlah kromosom oosit berubah dari diploid ($2n$) menjadi haploid ($1n$). Pembelahan ini selesai sebelum terjadinya ovulasi. Pembelahan meiosis kedua dimulai segera setelah pembelahan meiosis pertama selesai dan tetap berlangsung sebelum terjadinya fertilisasi oosit oleh spermatozoa (Bearden & Fuquay, 1980).

Oosit yang dimaturasi secara *in vitro* dalam media bebas gonadotropin akan mengalami pembelahan meiosis pertama, dimulai dari stadium *dictyate* fase profase pembelahan meiosis pertama sampai metafase I atau II seperti stadium yang dicapai pada saat ovulasi alami (Hafez, 1993). Keberadaan serum dalam medium *in vitro* penting untuk maturasi oosit. Serum sapi estrus dan serum sapi proestrus yang ditambahkan dalam medium untuk maturasi oosit secara *in vitro* dapat menghasilkan oosit masak, persentase fertilisasi oleh spermatozoa lebih tinggi (Lu *et al.*, 1987; Younis *et al.*, 1989). Hormon, *growth factor*, dan beberapa faktor lain yang terdapat dalam serum memainkan peran penting dalam matuarsi oosit (Kato & Iritani, 1993). Faktor-faktor tersebut diperlukan oleh kompleks kumulus oosit dan dapat mencegah terjadinya pengerasan zona pellusida sehingga meningkatkan penembusan oosit oleh spermatozoa dan meningkatkan jumlah oosit yang berkembang menjadi blastosis *in vitro* (Younis *et al.*, 1993; Budiono & Suzuki, 1996). Serum dan sel-sel kumulus memperpendek waktu yang diperlukan untuk pengeluaran benda kutub pada oosit yang dimaturasi *in vitro* dan juga mempermudah penembusan oosit oleh spermatozoa (Vaderhyden & Armstrong, 1989).

Usaha perbaikan mutu genetis ternak antara lain melalui program inseminasi buatan (IB), dan yang tercanggih alih janin (*embryo transfer*). Salah satu tahapan dalam proses alih janin adalah fertilisasi *in vitro* (*in vitro fertilization, IVF*). IVF bertujuan mempertemukan sel telur dan spermatozoa di luar uterus induk untuk mendapatkan sejumlah embrio dengan kualitas baik. Teknik IVF terdiri dari beberapa langkah meliputi: koleksi oosit, maturasi oosit, fertilisasi, dan pembiakan embrio *in vitro* (Gordon, 1994; Sato, 1989).

Fertilisasi secara normal terjadi di sepertiga bagian atas oviduk. Sperma menembus lapisan pembungkus sel telur setelah diovulasikan. Sperma harus melawan gerakan silia dari oviduk dan kontraksi otot uterus dan oviduk. Selain itu, prostaglandin yang terdapat di dalam cairan sperma ikut membantu kontraksi uterus. Menurut Moore (1982), faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan *in vitro fertilization* (IVF) antara lain, penanganan oosit dan komposisi medium kultur. Medium yang baik adalah medium yang memberikan aktivitas metabolisme oosit maksimal sehingga meningkatkan daya tahan hidup oosit. Kualitas media ditentukan oleh pH, komposisi nutrisi, dan suhu. Sperma secara struktural dapat dibedakan menjadi 3 bagian yaitu: ekor, badan, dan kepala. (1) Bagian ekor berupa flagela yang memungkinkan sperma bergerak mencapai sel telur dengan gerakan seperti berenang, (2) Bagian tengah banyak terdapat mitokondria yang berfungsi menyediakan tenaga (ATP) untuk mendukung gerakan sperma, (3) Bagian kepala sperma mengandung nukleus dengan jumlah kromosom haploid ($1n$) yang ditutupi oleh membran acrosom yang mengandung enzim hyaluronidase yang berfungsi untuk mempenetrasi sel telur pada saat fertilisasi.

Sel telur memiliki selubung corona radiata yang merupakan lapisan nutrien. Sel telur memiliki membran plasma yang disebut membran vittelina, dan selubung jelly yang disebut zona pellucida. Enzim acrosomal menembus zona pellucida sehingga filamen dari akrosom dapat menempel pada reseptor di membran vittelina. Reseptor tersebut bersifat spesies spesifik (*key and lock reaction*) artinya hanya spesies yang sejenis yang dapat berikatan. Kemudian membran plasma sel telur dan sperma mengalami penyatuan (*fusi*), menyebabkan nukleus dari sperma masuk. Setelah fusi nukleus, maka terbentuk zygote. Pada saat setelah fusi membran plasma sperma dan sel telur, maka membran plasma dan membran vittelina mengalami perubahan dan mencegah masuknya sperma lain. Membran vittelina berubah menjadi membran fertilisasi. Dengan demikian, hanya 1 sperma yang masuk ke dalam sel telur.

B. Maturasi Oosit

Maturasi oosit didefinisikan sebagai permulaan dan penyelesaian pembelahan meiosis pertama dari tahap *germinal vesicle* sampai pada tahap metafase II, yang diikuti oleh maturasi sitoplasma yang diperlukan untuk fertilisasi dan perkembangan awal embrio. Maturasi oosit secara konseptual dibagi menjadi maturasi nukleus dan maturasi sitoplasma. Maturasi nukleus berhubungan dengan pembelahan meiosis sampai pada tahap metafase II. Sedangkan maturasi sitoplasma berhubungan dengan persiapan sitoplasma oosit untuk fertilisasi dan perkembangan embrio (Chian *et al.*, 2003: 149). Maturasi oosit terdiri dari dua periode yaitu periode pertumbuhan dan persiapan akhir nukleus dan sitoplasma sebagai prasyarat untuk terjadi fertilisasi dan perkembangan embrio secara normal (Hafez, 1993). Pematangan nukleus diawali dari pecahnya membran nukleus (*germinal vesicle breakdown*, GVBD), hilangnya nukleoli dan kondensasi kromosom (Gordon, 1994). *Germinal vesicle breakdown*, menyebabkan pelepasan beberapa faktor nukleus, dan merangsang beberapa perubahan sitoplasma untuk perkembangan pronukleus jantan setelah penetrasi oosit oleh spermatozoa (Vaderhyden & Armstrong, 1989). Oosit primer akan mengalami dua kali pembelahan setelah GVBD, pembelahan meiosis pertama menghasilkan oosit sekunder dan benda kutub pertama yang tampak di dalam ruang perivitellina. Jumlah kromosom oosit berubah dari diploid (2n) menjadi haploid (1n). Pembelahan ini selesai sebelum terjadinya ovulasi. Pembelahan meiosis kedua dimulai segera setelah pembelahan meiosis pertama selesai dan tetap berlangsung sebelum terjadinya fertilisasi oosit oleh spermatozoa (Bearden & Fuquay, 1980).

Oosit yang dimaturasi secara *in vitro* akan mengalami pembelahan meiosis pertama, dimulai dari stadium *dictyate* fase profase pembelahan meiosis pertama sampai metafase I atau II seperti stadium yang dicapai pada saat ovulasi alami (Hafez, 1993). Keberadaan serum dalam medium *in vitro* penting untuk maturasi oosit. Serum sapi estrus dan serum sapi proestrus yang ditambahkan dalam medium untuk maturasi oosit secara *in vitro* dapat menghasilkan oosit masak, persentase fertilisasi oleh spermatozoa lebih tinggi (Lu *et al.*, 1987; Younis *et al.*, 1989). Hormon, *growth factor*, dan beberapa faktor lain yang terdapat dalam serum memainkan peran penting dalam maturasi oosit (Kato & Iritani, 1993). Faktor-faktor tersebut diperlukan oleh kompleks kumulus oosit dan dapat mencegah terjadinya pengerasan zona pellucida sehingga meningkatkan penetrasi oosit oleh spermatozoa dan meningkatkan jumlah oosit yang berkembang menjadi blastosis *in vitro* (Younis *et al.*, 1993; Budiono & Suzuki, 1996). Serum dan sel-sel kumulus

memperpendek waktu yang diperlukan untuk pengeluaran benda kutub pada oosit yang dimaturasi *in vitro* dan juga mempermudah penembusan oosit oleh spermatozoa (Vaderhyden & Armstrong, 1989).

1. Maturasi Nukleus

Maturasi nukleus ditandai dengan telah selesainya pembelahan meiosis II sampai pada tahap metafase II. Maturasi nukleus ini diawali dengan terjadinya *Germinal Vesicle Breakdown* (GVBD), yaitu hancurnya membran nukleus, pada saat folikel berada pada tahap folikel pra-ovulasi. Pada saat tersebut, dilepaskan *meiosis-inducing substance* untuk mempengaruhi oosit primer untuk menyelesaikan pembelahan meiosis I, menghasilkan 2 sel anakan yaitu oosit sekunder dan badan kutub pertama. Oosit sekunder kemudian memasuki pembelahan meiosis II dan tertahan pada tahap metafase sampai terjadi fertilisasi (Gartner, 2001: 467). Sebelumnya, oosit yang belum berkembang menjadi oosit yang siap diovulasikan berada dan masih dalam bentuk oosit primer dalam folikel primordial memasuki tahap profase pada meiosis I. Meiosis kemudian tertahan sampai sesaat sebelum ovulasi dalam tahap diploten oleh suatu faktor parakrin yang disebut *meiosis-preventing substance* yang diproduksi oleh sel folikuler atau disebut juga sel granulosa (Gartner, 2001: 463). Maturasi nukleus ini secara tidak langsung dikontrol oleh sel granulosa melalui sistem *gap junction* yang menyatukan oosit dengan sel-sel kumulus (Chian *et al.*, 2003:149). Sintesis protein dibutuhkan untuk GVBD. Sintesis protein diperlukan untuk perkembangan oosit dari tahap *germinal vesicle* sampai pada metafase II. Adanya faktor yang menghalangi sintesis protein pada oosit akan menyebabkan kegagalan dalam mengaktifkan *maturation promoting factor* (MPF). *Maturation promoting factor* bersama-sama dengan protein sitoplasma dan *cytotastic factor* (CSF) meregulasi maturasi nukleus pada oosit (Chian *et al.*, 2003: 149). *Maturation promoting factor* merupakan suatu molekul protein dimer yang tersusun atas katalitik p34^{cdc2} serin/treonin kinase, dan merupakan regulator dari siklin B subunit. p34^{cdc2} serin/treonin kinase adalah produk dari gen *cdc2*, yang pertama kali diidentifikasi pada pembelahan *yeast*. p34^{cdc2}-siklin heterodimer adalah suatu protein kinase yang mempunyai empat sisi fosforilasi yang diregulasi oleh kinase dan aktifitas fosfat. Sehingga, dapat diketahui bahwa produk dari *c-mos* proto-onkogen adalah protein-serin/treonin kinase dan memiliki pengaruh yang sama seperti CSF. Produk dari *c-mos* terekspresi pada awal maturasi oosit dan menghilang segera setelah terjadi fertilisasi. Oleh karena itu, metafase II tertahan karena adanya transkripsi dari *c-mos* ketika oosit telah matang. *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) pertama kali diidentifikasi pada sel somatik dan merupakan pusat regulasi penahan pembelahan meiosis pada oosit. *Mitogen-activated protein kinase* juga merupakan serin/treonin kinase tetapi bersifat mengaktifkan, bukan menghambat, yang diregulasi oleh fosforilasi treonin. Pengaktifan MAPK mendahului pengaktifan p34^{cdc2}. Penghambatan pada aktifitas MAPK dapat menghalangi terjadinya GVBD. Produk dari *c-mos* dan MAPK memiliki peranan penting pada siklus sel, mitosis dan meiosis. Pada manusia, MAPK merupakan molekul inaktif pada oosit *immature*, dan menjadi aktif pada oosit matur. Aktifitas MAPK menjadi berkurang setelah pembentukan pronukleus setelah fertilisasi. Namun demikian, mekanisme yang terlibat dalam GVBD, seperti jalur-jalur yang memberikan sinyal pada sel sehingga terjadi pematangan oosit sampai pada

metafase II karena adanya respon pada gelombang gonadotropin pra-ovulasi, belum sepenuhnya dapat dimengerti (Chian *et al.*, 2003: 149-150).

2. Maturasi Sitoplasma

Selama masa pertumbuhan dan maturasi oosit, berbagai produk telah disintesis dan disimpan dalam sitoplasma. Produk-produk ini mendukung perkembangan setelah terjadinya fertilisasi sampai genom embrio menjadi aktif bertranskripsi dan embrio mendapatkan sinyal untuk memulai regulasi embriogenesis. Sebagian besar RNA yang ada pada oosit mamalia, disintesis dan terakumulasi pada saat oosit sedang dalam masa pertumbuhan dan sintesis RNA berlanjut dengan tingkat yang rendah dalam waktu satu jam pada saat GVBD. Sebelum GVBD, sintesis protein meningkat dengan cepat pada oosit manusia selama maturasi dalam medium kultur dan RNA yang baru disintesis ini berperan penting dalam perkembangan embrio.

Sel-sel kumulus yang responsif terhadap gonadotropin menghasilkan berbagai hasil sekresi. Substansi hasil sekresi ini tidak hanya mengontrol maturasi nukleus, tetapi memberikan peranan penting pada maturasi sitoplasma. Maturasi sitoplasma yang kurang dapat menyebabkan oosit gagal untuk mendukung pembentukan pronukleus jantan sehingga akan meningkatkan kromosom abnormal setelah fertilisasi. Pada domba dan sapi, pembentukan pronukleus jantan pada saat fertilisasi oosit tergantung pada kehadiran sel-sel kumulus selama masa maturasi oosit (Chian *et al.*, 2003: 150).

C. Fertilisasi *in Vitro*

Fertilisasi *in vitro* (FIV) adalah suatu teknik yang meliputi pengambilan sel telur (oosit) dan sperma dari tubuh induk betina dan jantan kemudian menempatkan oosit dan sperma tersebut pada sebuah cawan petri. Di bawah mikroskop fase kontras, kepala sperma dipegang dan dipertemukan dengan sel telur sehingga terjadi fertilisasi. Sel telur yang terfertilisasi kemudian berkembang dalam kondisi *in vitro* selama beberapa hari dan kemudian ditransfer kepada betina resipien sehingga embrio dapat terus bertumbuh dan berkembang. Pada awalnya kesuksesan FIV ditandai dengan lahirnya seekor kelinci pada tahun 1959 dan disusul dengan lahirnya seekor tikus pada tahun 1968. Dan akhirnya pada manusia pada tahun 1978 dengan lahirnya seorang bayi bernama Louise Brown. Sejak saat itu, teknik FIV ini terus digunakan dan angka kesuksesan yang terus meningkat pada pasien-pasien dengan masalah infertilitas yang beragam. Pada 1981 sapi pertama lahir dengan teknik FIV ini. Saat ini FIV adalah satu-satunya teknik yang dapat mengatasi masalah keturunan pada pasangan infertil. Pada umumnya masalah infertilitas yang dihadapi adalah rendahnya tingkat viabilitas sel sperma yang menyebabkan sel sperma tersebut tidak dapat mencapai sel telur sehingga tidak dapat terjadi proses pembuahan. Selain itu penyumbatan *tuba fallopii* pada saluran reproduksi wanita juga dapat menghambat terjadinya pembuahan. Kondisi fisiologis saluran reproduksi wanita juga dapat merupakan salah satu masalah infertilitas.

Pada hewan, selain untuk mengatasi masalah infertilitas, penggunaan teknik FIV ini juga dapat digunakan untuk memperbaiki mutu genetik dan meningkatkan jumlah ternak. Masalah infertilitas pada hewan, misalnya sapi, adalah umur yang tua sehingga sudah tidak mampu lagi untuk melahirkan, adanya suatu penyakit pada saluran reproduksi, atau ovarium yang hanya berkembang sebelah. Keseluruhan prosedur yang dilakukan selama pelaksanaan FIV adalah sama antara hewan dan manusia. Pada dasarnya langkah-langkah yang dilakukan dalam FIV adalah:

- 1) Koleksi oosit dari induk betina. Koleksi oosit dilakukan setelah dilakukan superovulasi dengan penyuntikan hormon FSH pada donor oosit. Pada hewan ternak, selain dengan teknik superovulasi, oosit dapat diperoleh dari ovarium hewan ternak yang sudah mati atau dari penyembelihan di Rumah Potong Hewan. Dari koleksi oosit tersebut, pada oosit yang belum matang kemudian dilakukan pematangan dengan menempatkan oosit pada medium kultur yang sesuai dan diinkubasi pada suhu 37-38,5°C selama 24 jam. Oosit masak ditandai dengan adanya ekspansi sel-sel kumulus (*cumulus oocyte complex*: COC).
- 2) Fertilisasi oosit oleh sperma di laboratorium. Setelah 24 jam dalam medium maturasi, COC yang sudah masak kemudian dicuci dan dipindahkan ke dalam medium kultur khusus FIV. Selanjutnya sperma ditambahkan ke dalam medium dengan konsentrasi yang sesuai untuk kapasitasasi dan fertilisasi.
- 3) Pengembangan zigot secara *in vitro*. Setelah terjadi fertilisasi, zigot diinkubasi pada 37-38,5°C selama 18 jam. Setelah 18 jam, zigot yang mengalami perkembangan yang baik kemudian dicuci dan dipindahkan dari medium FIV ke medium kultur. Di dalam medium kultur ini terdapat sel tuba uterina yang berfungsi untuk pemacu pertumbuhan embrio sehingga embrio dapat berkembang dengan maksimal. Embrio tersebut kemudian diinkubasi selama 7 hari, dan diamati perkembangannya setiap 2 hari.
- 4) Transfer embrio kepada resipien. Setelah inkubasi selama 7 hari, embrio dalam fase blastosis kemudian ditransfer kepada induk resipien.

D. Medium Kultur

Suatu medium dapat digunakan sebagai medium kultur sel jika memenuhi berbagai persyaratan, antara lain medium tersebut harus dapat menyediakan semua nutrisi yang dibutuhkan oleh sel yang dikultur, berada pada pH antara 7-7,3, isotonik dengan plasma sel yang dikultur, dan medium tersebut harus steril (Primrose, 1990: 99). Medium yang digunakan untuk fertilisasi tersebut pada dasarnya sama dengan medium yang digunakan untuk maturasi oosit. Medium kultur yang biasanya digunakan antara lain *Minimal Essential Medium* (MEM) dan *Tissue Culture Medium-199* (TCM-199). *Minimal Essential Medium* (MEM) merupakan medium yang sederhana, yang mengandung asam amino esensial, vitamin B kompleks, dan garam mineral. Sedangkan TCM-199 merupakan medium yang lebih kompleks yang mengandung lebih banyak jenis asam amino dan vitamin, dan juga seringkali ditambah dengan mineral dan metabolit ekstra, misalnya nukleosida. Asam amino, khususnya glutamin, merupakan sumber energi dan sumber karbon bagi sel dalam medium kultur. Vitamin dalam medium diperlukan untuk daya tahan sel, dan garam organik diperlukan untuk menjaga osmolalitas medium (Freshney, 1990: 71-72).

Penggunaan kedua medium ini sebagai medium kultur harus ditambah dengan serum, yang merupakan komponen penting dalam medium kultur, antibiotik seperti *Penicillin* dan *Streptomycin* untuk membunuh bakteri dan mikroorganisme yang tidak diinginkan dalam medium kultur, dan antijamur seperti *fungizone*. Serum adalah plasma atau cairan dalam darah tanpa fibrinogen (Mader, 1998: 114). Serum ini merupakan sumber protein, hormon, faktor pertumbuhan, glukosa, asam keto, mineral seperti zat besi, tembaga, dan seng yang terikat pada protein serum, serta inhibitor yang menghambat proliferasi sel (Freshney, 1990: 73). Selain penting, serum inilah yang membuat medium kultur berharga mahal (Nandi *et al.* 2004: 33). Serum yang biasa digunakan antara lain *Fetal Bovine Serum* (FBS) atau dikenal

dengan serum fetus sapi, serum sapi estrus, serum kuda, dan serum manusia (Freshney, 1990: 72).

Protein adalah komponen utama yang terkandung di dalam serum. Beberapa jenis protein, seperti albumin, globulin, dan fetuin pada serum fetus, berperan dalam pertumbuhan dan pengikatan sel, sedangkan jenis protein lain seperti transferin berfungsi mengikat zat besi yang diperlukan oleh sel. Selain itu, protein juga berfungsi untuk membawa asam lemak dan hormon (Freshney, 1990: 73). Serum, selain sebagai sumber protein juga merupakan sumber hormon. Hormon yang terkandung di dalam serum antara lain estradiol, *Follicle Stimulating Hormon* (FSH), *Luteinizing Hormon* (LH), *Thyroid Stimulating Hormon* (TSH) (Nandi *et al.* 2004: 36), insulin, dan hormon pertumbuhan, serta hidrokortison (Freshney, 1990: 73). Estradiol, FSH, dan LH bekerja sama secara sinergis dalam proses pengembangan sel-sel kumulus (Susilorini dkk., 2003: 56). Hormon estradiol 17β atau dikenal dengan estrogen berfungsi merangsang sel-sel granulosa untuk merespon gonadotropin dan merangsang proliferasi sel-sel granulosa. Selain itu, estrogen juga berguna untuk menyempurnakan pematangan inti dan sitoplasma oosit. *Luteinizing Hormon* (LH) dalam medium IVM berfungsi untuk merenggangkan hubungan antara sel-sel kumulus dengan oosit. Selain itu, LH juga berfungsi untuk mengubah distribusi kalsium dalam ooplasma, meningkatkan glikolisis dan oksidasi glukosa mitokondria dalam sel-sel kumulus, serta meningkatkan metabolisme glutamin dalam oosit (Susilorini dkk., 2003: 56-57). Insulin dalam serum berfungsi mendukung pengambilan glukosa dan asam amino. Hormon pertumbuhan yang berkonjugasi dengan somatomedin dapat menimbulkan efek mitogenik. Sedangkan hidrokortison dapat mendukung proliferasi dan pengikatan sel. Glukosaberperan sebagai sumber energi metabolisme sel (Freshney, 1990: 73).

Berbagai faktor pertumbuhan juga terdapat dalam serum. Suatu polipeptida yang dinamakan *platelet-derived growth factor* (PDGF) merupakan faktor pertumbuhan dengan konsentrasi terbesar dalam serum. Faktor pertumbuhan ini mempunyai aktifitas mitogenik dan merangsang pertumbuhan sel, misalnya pada sel fibroblas dan sel glia. Sedangkan faktor pertumbuhan lain seperti *fibroblast growth factor* (FGF), *epidermal growth factor* (EGF), *endothelial growth factor*, *multiplication-stimulating activity* (MSA), dan *insulin-like growth factor* (IGF-I dan IGF-II) yang merupakan homolog MSA terdapat dalam serum walaupun sedikit (Freshney, 1990: 73).

1. Minimal Essential Medium (MEM)

Salah satu jenis medium kultur yang digunakan sebagai medium maturasi oosit secara *in vitro* adalah MEM. Medium ini mengandung asam amino dengan konsentrasi tinggi yaitu, 555,50 mg/l, glukosa anhidrat, vitamin, garam anorganik, dan pewarna merah (*phenol red*). Asam amino dalam perkembangan oosit digunakan untuk sintesis protein, berperan dalam osmolalitas, buffer intraseluler, dan sumber energi. Glukosa merupakan substrat energi untuk meningkatkan maturasi nukleus oosit *in vitro*. Glukosa oleh sel kumulus diubah menjadi piruvat untuk mendukung maturasi oosit dari meiosis menuju metafase II. Sintesis piruvat dari glukosa oleh sel kumulus akan membuat sel kumulus mampu memberikan nutrisi dalam proses maturasi oosit. Sedangkan vitamin yang terdapat di dalam media berfungsi mempengaruhi metabolisme glukosa pada perkembangan embrio.

Untuk membuat larutan penumbuh sebagai medium kultur selain diperlukan MEM juga diperlukan FBS (*Fetal Bovine Serum*), antibiotik pennicilin dan streptomycin, dan Fungizone. FBS mengandung berbagai faktor pertumbuhan yang dibutuhkan untuk maturasi oosit. Sedangkan antibiotik Streptomycin & Pennicilin berfungsi untuk membunuh bakteri dan mikroorganisme yang tidak diinginkan dalam proses maturasi oosit. Begitu juga dengan Fungi Zona yang berfungsi sebagai anti jamur dalam proses maturasi oosit.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

A. Tujuan Penelitian

Tujuan jangka panjang dari penelitian ini adalah menemukan metode baru pematangan oosit dan medium untuk metode fertilisasi *in vitro* (IVF) dengan menggunakan kultur sel granulosa (KSG) dalam rangka alih janin (*embryo transfer*).

Tujuan penelitian tahun pertama ini adalah membuktikan bahwa KSG folikel ovarium domba dapat digunakan sebagai medium untuk maturasi oosit domba dengan parameter oosit domba dapat berkembang dengan baik dengan persentase oosit yang mengalami pembentukan kumulus ooforus sempurna pada inkubasi 24 jam adalah sebesar 75 %.

B. Manfaat Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel oosit dan sel granuloze dari folikel ovarium domba sebagai obyek penelitian, dengan pertimbangan domba merupakan hewan ternak yang dalam satu siklus estrus dapat mengovulasikan 4-5 ova (Sihombing, 1997: 117) dan ovarium domba berukuran cukup besar dengan panjang 1-2 cm sehingga memudahkan peneliti untuk mengambil sampel penelitian. Adapun manfaat yang diharapkan dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut: Jika KSG dapat digunakan sebagai media maturasi oosit, maka temuan hasil penelitian ini adalah suatu inovasi metode maturasi oosit yang selama ini menggunakan medium artifisial yang mahal harganya menjadi KSG yang relatif murah harganya diharapkan sebagai pengganti medium kultur yang masih diimpor dan mahal harganya.

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental, Adapun desain yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri atas kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok terdiri dari 50 ulangan. Pengelompokan dilakukan secara random setelah aspirasi (pengambilan) oosit dari folikel ovarium dengan ukuran 1-2 mm. Kelompok tersebut adalah:

- Kelompok kontrol : oosit *immature* + MEM
- Kelompok perlakuan I : oosit *immature* + KSG + FBS 5%
- Kelompok perlakuan II : oosit *immature* + KSG + FBS 10%

B. Tempat & Waktu Penelitian

Pelaksanaan pembuatan KSG dari folikel ovarium domba dan penanaman oosit secara *in vitro* dilakukan di Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran UGM Yogyakarta. Demikian juga untuk pengamatan perkembangan dan pengambilan fotomikrograf dari oosit yang telah mengalami maturasi dilakukan di Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran UGM.

C. Populasi & Sampel Penelitian

- Populasi dari penelitian ini adalah oosit dari folikel ovarium domba.
- Sampel yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah oosit domba *immature* dari folikel ovarium dengan diameter 1-2 mm.

D. Variabel Penelitian

- Variabel bebas: Jenis medium maturasi, yaitu MEM, dan KSG folikel ovarium domba dengan penambahan berbagai variasi konsentrasi FBS.
- Variabel tergayut: Tingkat perkembangan/ekspansi sel kumulus.

E. Alat dan Bahan Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- **Alat:** *Laminar air flow*, *autoclave*, sentrifuse, inkubator 95% oksigen dan 5% karbondioksida, *vortex (mixer)*, *inverted microscope*, *fotomicrograph*, pipet mikro ukuran 5-50 μ l, termos es.
- **Bahan:** Ovarium domba, oosit domba, cairan folikel domba, MEM (*Minimal Essential Medium*), serum fetus sapi, *pennicilin-streptomycin*, dan *fungizone*; NaCl fisiologis 0,9%, *multiwells plate* 96 sumuran, spuit steril ukuran 26 gauge, tip pipet mikro, gunting steril, *gloves* (sarung tangan karet).

F. Prosedur Penelitian

1. Pengumpulan Ovarium dari Rumah Potong Hewan (RPH)

Ovarium diperoleh dari domba betina berumur 1-2 tahun yang dipotong di RPH, kemudian dimasukkan dalam media koleksi (kantong plastik dan dimasukkan ke dalam termos berisi es batu) dan secepatnya dilakukan proses pengambilan oosit untuk menjaga viabilitas sel telur yang terdapat didalam folikel ovarium.

2. Koleksi Cairan Folikel Pengambilan oosit dari folikel (aspirasi oosit)

Ovarium domba dicuci dengan air kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker berisi NaCl fisiologis steril. Ovarium dicuci dengan NaCl 0.9% (b/v) dengan suhu 37°C sebanyak tiga kali dan dikeringkan dengan kertas tissue. Aspirasi oosit yang belum matang (*immature*) dari folikel berukuran 2-6 mm menggunakan spuit dengan ukuran jarum 18 G. Oosit *immature* serta cairan

folikel dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml larutan pencuci oosit kemudian didiamkan 10 menit. Supernatan dibuang dan pada endapan ditambah lagi larutan pencuci oosit, diulang sampai tiga kali. Kualitas oosit yang belum matang ditentukan berdasarkan penilaian visual dari kekompakan dan banyaknya sel folikel. Oosit yang dipakai adalah yang termasuk dalam kategori kualitas A (Madison *et al.*, 1992).

3. Proses Penanaman & Pematangan Oosit

- a. Supernatan dari sentrifugasi cairan folikel diambil dan digunakan sebagai medium pematangan. Cairan tersebut dimasukkan ke dalam 48 sumuran *multiwells plate* sebanyak 100 μ l, dan 48 sumuran sisanya diisi dengan medium penumbuh MEM sebanyak 100 μ l, dan dibuat KSG.
- b. Pelet dan sisa supernatan pada tabung sentrifuse di vortex selama 1 menit kemudian dimasukkan ke dalam 96 sumuran *multiwells plate* sebanyak 50 μ l.
- c. *Multiwell plate* dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ 5% dengan temperature 37°C selama 28 jam dan diamati tingkat maturasi dan kerusakan tiap 24 jam selama 3 kali 24 jam.

4. Evaluasi Perkembangan & Kerusakan Kumulus

Oosit yang sudah dimaturasi selama 24 jam diamati pengembangan (ekspansi) kumulusnya dibawah *inverted microscope* dengan pembesaran 200x, selanjutnya diklasifikasikan dalam tiga tingkat yaitu:

- 0 : tidak ada ekspansi sel kumulus
- 1 : sel kumulus terekspansi sebagian
- 2 : sel kumulus terekspansi secara sempurna

G. Analisis Data

Data hasil pengamatan yang diperoleh di analisis dengan menggunakan metode deskriptif kualitatif dan analisis varian satu arah (Anova). Jika terdapat perbedaan bermakna dilanjutkan dengan uji beda rerata *Duncan Multiple Range Test (DMRT)* untuk mengetahui perbedaan pengaruh antarperlakuan. Perbedaan dianggap signifikan apabila nilai $P < 0,05$.

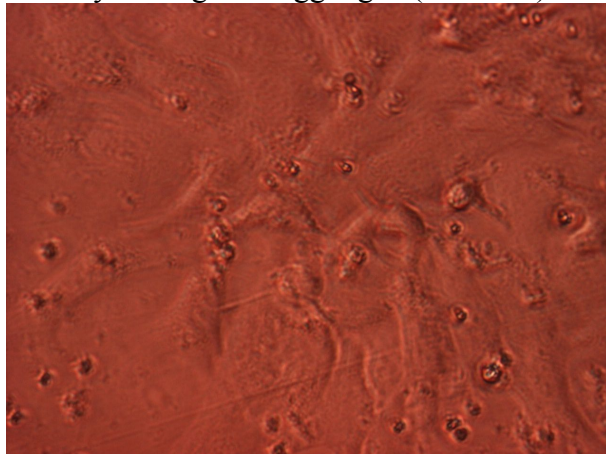
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Hasil kultur sel granulosa

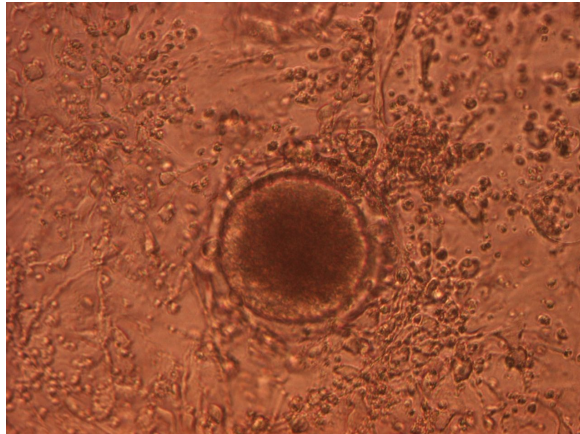
Penelitian ini memerlukan kultur sel granulosa folikel ovarium domba sebagai medium untuk pertumbuhan oosit. Oleh karena itu, sebagai persyaratan terlaksananya penelitian ini pertama kali yang harus disediakan adalah tersedianya kultur sel granulosa folikel ovarium domba (KSG). Hasil pengamatan sel granulosa yang diaspirasi dari folikel ovarium domba setelah ditanam dalam medium kultur dan diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5% dan udara 95% selama 24 jam menunjukkan bahwa sel granulosa folikel ovarium domba memiliki kemampuan untuk hidup dan tumbuh dengan baik pada medium kultur dan menempel pada dasar sumuran cawan kultur (*multiwells plate*). Hasil pengamatan kultur sel granulosa folikel ovarium setelah inkubasi selama 72 jam menunjukkan bahwa pertumbuhan sel granulosa telah menyebar merata memenuhi permukaan dasar cawan kultur, sel satu dengan lainnya saling bersinggungan (konfluen).



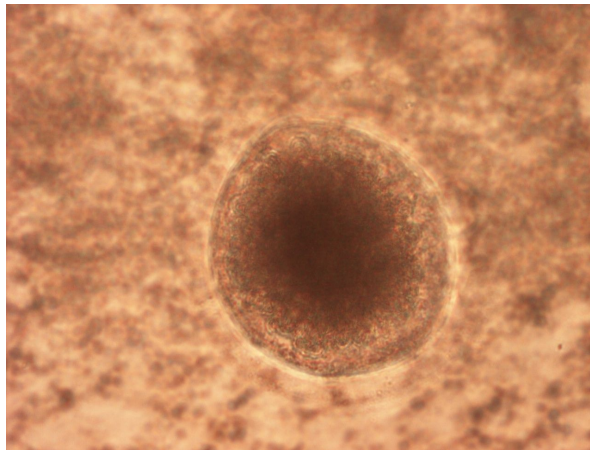
Gambar 1. Foto mikroskopis kultur sel granulosa folikel ovarium domba pada kondisi konfluen setelah diinkubasi selama 72 jam (3 Hari) (Perbesaran 400 x).

2. Perkembangan oosit

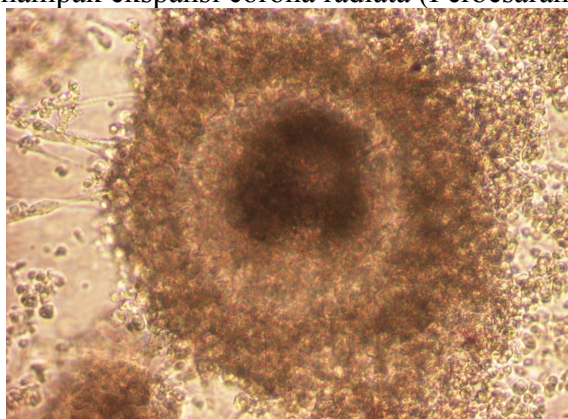
Hasil pengamatan oosit yang diaspirasi dari ruang antral folikel ovarium domba (tahap folikel tersier) setelah dimaturasi pada KSG + FBS 10% menunjukkan bahwa oosit terlihat dikelilingi oleh corona radiata yang sempurna, menempel pada dasar sumuran dan belum nampak adanya ekspansi kumulus ooforus seperti pada gambar 2 berikut ini.



Gambar 2. Foto mikroskopis oosit domba setelah diinkubasi selama 24 Jam (1 Hari). Corona radiata berkembang secara sempurna. A. Inti sel telur, b. Zona pellucida, c. Corona radiata (Perbesaran 400 x).



Gambar 3. Foto mikroskopis oosit domba setelah diinkubasi selama 24 Jam (2 Hari), nampak ekspansi corona radiata (Perbesaran 400 x).



Gambar 4. Foto mikroskopis oosit domba setelah diinkubasi selama 72 Jam (3 Hari) (Perbesaran 400 x).
Hasil pengamatan ekspansi sel-sel kumulus pada medium MEM, KSG

+ FBS 5%, dan KSG + FBS 10% terhadap perkembangan corona radiata menunjukkan hasil terlihat adanya kenaikan jumlah sel yang menunjukkan adanya proliferasi. Pengaruh jenis medium terhadap tingkat perkembangan kumulus ooforus pada berbagai medium: MEM, KSG + FBS 5%, dan KSG + FBS 10% terhadap pertumbuhan corona radiata oosit dapat dilihat pada tabel 1 berikut.

Tabel 1. Tingkat Perkembangan kumulus ooforus pada berbagai medium: MEM, KSG + FBS 5%, dan KSG + FBS 10%

Jenis Medium	Jumlah Oosit	Tingkat Perkembangan			Keterangan
		0	1	2	
MEM	52	0,62	0,27	0,12	Sedang
KSG + FBS 5%	55	0,42	0,36	0,22	Baik
KSG + FBS 10%	55	0,25	0,47	0,27	Amat baik

Keterangan:

3. Tidak ada ekspansi sel-sel kumulus ooforus
4. Ekspansi sel-sel kumulus ooforus sebagian
5. Ekspansi sel-sel kumulus ooforus sempurna

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ekspansi sel-sel kumulus ooforus pada kelompok MEM paling sedikit, sedangkan pada KSG + FBS 5%, dan KSG + FBS 10% ekspansi sel-sel kumulus ooforus lebih intensif, namun demikian persentase ekspansi kumulus paling optimal dijumpai pada kelompok yang dimatangkan dengan medium KSG + FBS 10%, yaitu sebesar 0.27%.

B. Pembahasan

Oosit setelah diinkubasikan dalam berbagai medium: MEM, KSG + FBS 5%, dan KSG + FBS 10% selama 24 jam dan diamati dengan menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 400x terlihat bahwa oosit dikelilingi oleh sel-sel kumulus ooforus yang sempurna, menempel pada dasar sumuran dan belum nampak adanya ekspansi sel-sel kumulus. Hasil pengamatan setelah inkubasi selama 24 jam menunjukkan bahwa ekspansi sel-sel kumulus ooforus pada kelompok MEM paling sedikit, sedangkan pada KSG + FBS 5%, dan KSG + FBS 10% ekspansi sel-sel kumulus ooforus lebih intensif, namun demikian persentase ekspansi kumulus paling optimal dijumpai pada kelompok yang dimatangkan dengan medium KSG + FBS 10%, yaitu sebesar 65.40%. Menurut Maddison *et al.* (1992), ekspansi sel-sel kumulus ooforus mulai terlihat pada masa inkubasi umur 48 jam (2 hari) yang ditandai oleh adanya kumulus ooforus. Pengamatan terhadap perkembangan kumulus ooforus menunjukkan adanya kenaikan jumlah sel yang menunjukkan adanya proliferasi sel. Oosit yang diperoleh dari folikel ovarium hewan betina yang disembelih termasuk oosit yang belum matang dan belum siap dibuahi karena belum diovolasikan walaupun oosit beserta kompleks sel cumulus. Agar oosit hasil aspirasi tersebut siap dibuahi, maka perlu proses penyempurnaan pematangan secara *in vitro* dengan menggunakan teknik maturasi oosit secara *in vitro* (IVM) selama 3-6 jam (Ita Fauzia Hanum dkk., 2003). Secara *in vivo*, pertumbuhan oosit mulai terlihat pada masa inkubasi umur 48 jam (2 hari) yang ditandai oleh adanya corona radiata. Sel-sel granulosa lebih banyak tumbuh pada suatu tempat pada

dinding folikel sehingga membentuk masa sel yang padat yang disebut kumulus ooforus yang mengandung oosit. Kumulus ooforus menonjol ke bagian dalam antrum folikuli setelah itu oosit tidak mengalami pertumbuhan lagi. Oosit melekat pada dinding folikel dengan perantara pedikel yang dibentuk oleh sel-sel granulosa. Karena sel granulosa tidak bertambah banyak sebanding dengan penimbunan cairan, maka lapisan sel granulosa menjadi lebih tipis. Sel-sel granulosa membentuk lapisan pertama yang meliputi oosit. Dan oki berhubungan erat dengan zona pellucida. Menurut .. folikel antral berisi cairan dan oosit yang telah mengalami pembelahan pada tahap metafase dari meiosis II. Oosit tidak mengalami pertumbuhan lagi dan dikelilingi dengan zona pellucida yang membentuk corona radiata. Inti dalam status fase profase pembelahan meiosis pertama. Oosit dapat tumbuh dan berkembang secara *in vivo* karena rongga folikel menjadi lingkungan interna yang sesuai dan cocok selain mengandung berbagai substansi juga kondisi seperti suhu pH untuk pematangan oosit. KSG dapat mensintesis dan menskresikan berbagai substansi tertentu untuk pematangan oosit.

Pada kelompok yang ditumbuhkan pada medium yang diberi KSG + FBS 5% terlihat terjadi peningkatan pertumbuhan sel kumulus ooforus. Peningkatan pertumbuhan sel kemungkinan disebabkan karena adanya substansi yang terkandung dalam KSG yang secara langsung berguna merangsang pertumbuhan oosit. Medium yang baik adalah medium yang memberikan aktivitas metabolisme sel/jaringan secara maksimal sehingga meningkatkan daya tahan hidup sel/jaringan. Kualitas media ditentukan oleh pH, komposisi nutrisi, dan suhu. Menurut Freshney (1990) perubahan lingkungan kultur seperti tekanan osmose menyebabkan lingkungan kultur tidak sesuai lagi bagi pertumbuhan sel dan akan menyebabkan hambatan bahkan kematian sel. Hal tersebut kemungkinan karena baik cairan folikel maupun KSG mengandung komponen-komponen yang dibutuhkan dalam perkembangan oosit.

Kultur sel granulosa folikel ovarium, Menurut Freshney (1990) bahwa pada saat kultur primer berada pada kondisi konfluen, sel yang terdapat pada kultur tersebut menunjukkan morfologi dan fungsi yang spesifik yang sangat mirip dengan jaringan asalnya. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Heru Nurcahyo (1999), setelah beberapa saat ditanam pada medium kultur yang sesuai, maka sel hewan akan mengalami adaptasi dan seleksi lebih lanjut yakni sel yang dapat beradaptasi dengan lingkungan kultur akan hidup dan mengalami proliferasi, beberapa sel dapat hidup tetapi tidak mampu berproliferasi, dan sebagian lainnya mengalami kematian. Dilaporkan oleh Mattioli (1994), bahwa sel-sel granulosa membentuk lapisan pertama yang meliputi oosit, karena sel granulosa tidak bertambah banyak sebanding dengan penimbunan cairan, maka lapisan sel granulosa menjadi lebih tipis dan oleh karenanya memiliki hubungan erat dengan zona pellucida. Sel-sel kumulus ooforus adalah sel-sel granulosa yang menempel pada oosit menonjol ke bagian dalam antrum folikuli setelah itu oosit tidak mengalami pertumbuhan lagi. Oosit melekat pada dinding rongga folikel (antrum) dengan perantara pedikel yang dibentuk oleh sel-sel granulosa, dan dindingnya berfungsi sebagai agen komunikasi antara sel penghubung mekanisme hormonal menuju oosit karena pada sel-sel kumulus terdapat reseptor FSH dan LH. Selain itu, sel-sel kumulus berperan juga dalam

pemasokan nutrisi untuk keperluan oosit. Sel-sel kumulus mengalami ekspansi apabila terangsang oleh peningkatan aktifitas gonadotropin dan metabolisme seluler tersebut (De Haan, 1994). Sel-sel kumulus berperan sangat penting dalam proses pematangan oosit dan berdasarkan tingkat ekspansinya dapat di evaluasi tingkat kematangannya. Maturasi sitoplasma oosit ditandai dengan terjadinya ekspansi sel kumulus yang berperan menciptakan lingkungan mikro oosit berupa peningkatan kebutuhan makanan oosit (Kennedy *et al.*, 1994). Hubungan yang sangat dekat antara sel-sel granulosa dan sel kumulus di sekitar oosit akan mengakibatkan pematangan oosit tertahan sehingga tidak mengalami meiosis, apabila hubungan ini sudah merenggang oleh faktor-faktor pematangan oosit dan atau sel kumulus yang terekspansi akan mengakibatkan *gap junction* dengan cepat menurun jumlahnya yang berakibat akses penghambatan berlangsungnya meiosis berkurang drastis. Mattioli (1994) berpendapat bahwa sel-sel kumulus mempunyai peran sebagai alat spesifik dalam mekanisme transduksi untuk mentransfer sinyal gonadotropin ke oosit melalui sistem *gap junction*. Peranan lain dari sel-sel kumulus adalah pada saat fertilisasi yakni dalam reaksi akrosom spermatozoa, peran ini dikarenakan sel-sel kumulus banyak mengandung asam hyaluronat. Peningkatan ekspansi sel-sel kumulus ooforus kemungkinan disebabkan karena adanya zat-zat yang dihasilkan oleh sel granulosa yang berguna memberikan aktivitas metabolisme sel/jaringan secara maksimal sehingga meningkatkan daya tahan hidup sel/jaringan dan merangsang pertumbuhan sel. Sel kumulus yang terdapat di sekeliling oosit dirangsang secara *in vitro* oleh LH dan estrogen yang terdapat dalam cairan folikel sehingga protein atau hormon dapat menghalangi aksi inhibitor folikular dan pemacu meiosis dibentuk dalam kumulus oosit kompleks. Menurut Heru Nurcahyo (2000), KSG menghasilkan hormon estrogen dan juga progesteron. Dilaporkan oleh Larocca *et al.* (1993), cairan folikel sebagai medium maturasi meningkatkan persentase *cleavage* dan kemampuan untuk berkembang menjadi blastosis. Kim *et al.*, (1993) melaporkan bahwa konsentrasi cairan folikel sebesar 60% yang ditambahkan pada medium MIV berpengaruh menghambat pematangan oosit, hal ini disebabkan oleh koagulasi sel kumulus oleh bahan seperti fibrin yang terdapat di dalam cairan folikel, tetapi pada konsentrasi yang rendah (10%) berpengaruh sebaliknya memacu maturasi oosit sapi. Apabila digunakan cairan folikel dengan konsentrasi yang tinggi pada medium kultur, akan terjadi penurunan maturasi inti, angka fertilisasi dan kemampuan berkembang setelah fertilisasi. Hal ini kemungkinan disebabkan karena tidak terjadi maturasi sitoplasma selama proses maturasi oosit akibat faktor penghambat seperti kelompok purin (adenosine dan hypoxanthin) yang terdapat dalam cairan folikel. Homa & Brown (1992) telah meneliti kandungan asam lemak pada cairan folikel sapi dan didapatkan hasil bahwa asam linoleat dibutuhkan untuk memelihara terjadinya proses meiosis pada oosit, penurunan konsentrasi asam linoleat menghambat pecahnya germinal vesikel. Kualitas oosit sangat dipengaruhi oleh tingkat maturasi yang dihasilkan, seperti halnya yang dijelaskan oleh Gordon (1994) bahwa oosit dengan morfologi bagus yaitu kumulus berlapis-lapis, kompak, ooplasma homogen, penampilan COC terang dan transparan menghasilkan lebih banyak oosit *mature* setelah MIV. Telah diketahui bahwa hubungan antara sel-sel kumulus dan oosit sangat penting, tidak

hanya dalam proses maturasi oosit ke stadium *metaphase* II tetapi juga pada maturasi sitoplasma yang diperlukan untuk perkembangan oosit setelah fertilisasi (Moor *et al.*, 1990, Ka *et al.*, 1997). Interaksi sel kumulus dan oosit menghasilkan *glycosaminoglycan*, hormon steroid, nutrisi, dan faktor-faktor lain yang mendukung maturasi oosit (Yanagimachi dan Nagai, 1999, Dode dan Graves, 2002). Pada domba, pelepasan sel-sel kumulus pada proses maturasi oosit *in vitro* hanya menghasilkan oosit matur sebanyak 28,7% (Wongsrikeao *et al.*, 2005). Ekspansi kumulus sangat menentukan kematangan oosit, mengingat kumulus mengandung berbagai bahan aktif yang diperlukan oosit selama meiosis. Pada proses ekspansi kumulus selain dipengaruhi oleh hormon. Proses ekspansi kumulus ooforus kaitannya dengan proses maturasi oosit dipengaruhi oleh berbagai hormon dan faktor pertumbuhan. Penambahan faktor pertumbuhan ke media pematangan oosit meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel kumulus (Margawati, 1999). Perluasan OKK diikuti dengan peningkatan asam hyaluronat yang diperkaya matriks ekstraselular dan modifikasi *gap junction* antara sel kumulus dan oosit. Selanjutnya, terjadi pelepasan kompleks kumulus oosit dari folikel selama ovulasi. Perkembangan sel-sel kumulus menciptakan lingkungan mikro (*microenvironment*) yang sesuai untuk pematangan oosit dan pengaktifan dan motilitas sperma. Ekspansi kumulus sangat dipengaruhi oleh proliferasi sel, penurunan proliferasi sel kumulus akan mempengaruhi kematangan oosit secara keseluruhan. Ekspansi kumulus sangat menentukan kematangan oosit, mengingat kumulus mengandung berbagai bahan aktif yang diperlukan oosit selama meiosis. Hormon estrogen dan progesteron yang dihasilkan oleh KSG berperan dalam menginisiasi DNA dari sel-sel kumulus untuk berproliferasi. Estrogen bekerja secara parakrin dan autokrin yang merangsang aktivitas mitogenik pada jaringan yang mengalami proliferasi seperti transformasi folikel ovarium menjadi korpus luteum (Hafez, 2000). Hormon FSH, LH, dan estrogen sering digunakan dalam medium kultur untuk meningkatkan kualitas oosit (Beker *et al.*, 2000). Penambahan media maturasi dengan hormon- hormon ini bermula dari dugaan keterlibatan hormon-hormon ini dalam proses maturasi *in vivo*. Namun demikian, folikulogenesis dan maturasi oosit diregulasi tidak hanya oleh gonadotropin dan steroid tetapi juga oleh beragam *cytokine* yang bekerja sebagai parakrin yang dihasilkan secara lokal. Di antara regulator ini terdapat beberapa faktor pertumbuhan antara lain TGF β (Beker *et al.*, 2000). Sel kumulus mensekresi *estradiol* dirangsang oleh FSH yang penting untuk pertumbuhan dan maturasi oosit. Oosit dan sel kumulus berperan penting dalam regulasi pensinyalan reseptor *estradiol* selama proses IVM. Reseptor *estradiol* menekan produksi cAMP selama meiosis. Sel kumulus sangat diperlukan untuk proses maturasi oosit dan fungsi regulasi oosit (Epig, 2004). Dengan demikian, kultur sel granulosa dari folikel ovarium domba dapat dimanfaatkan sebagai bahan untuk pematangan oosit secara *in vitro*.

BAB VI RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

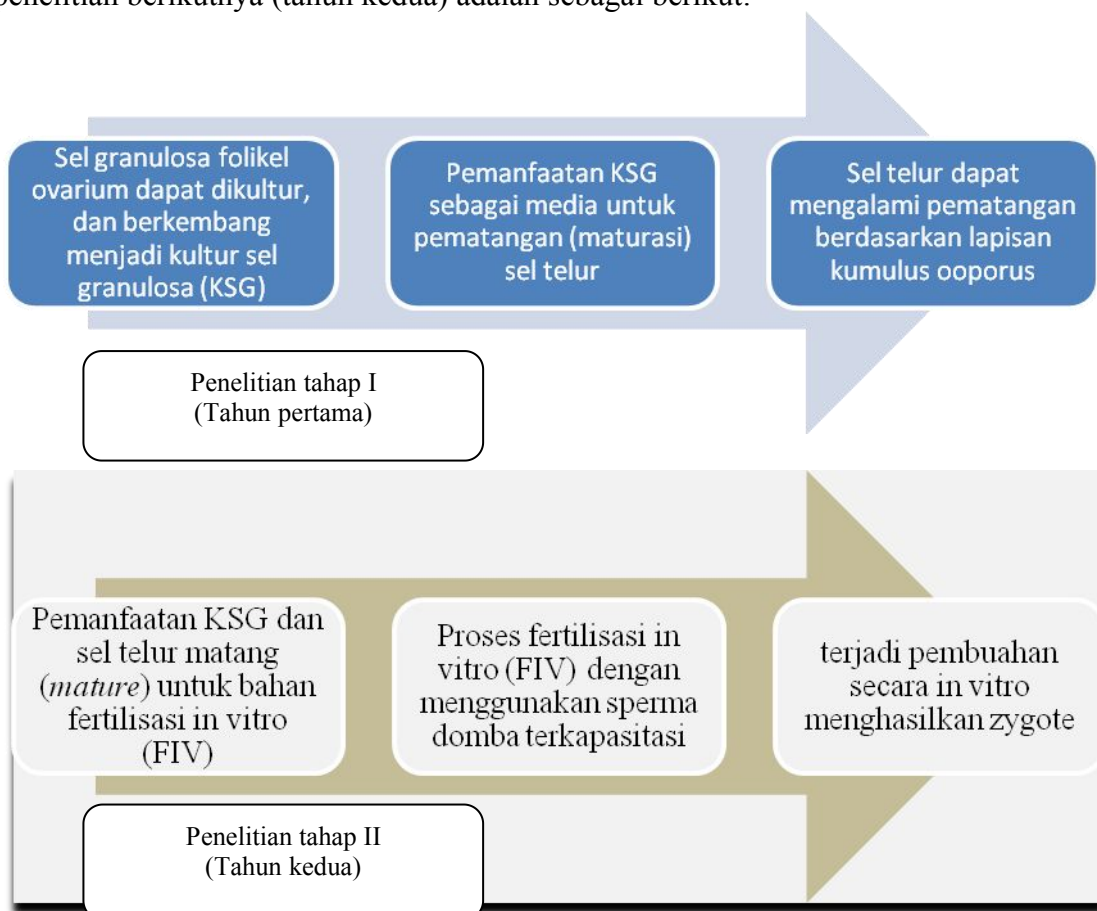
A. Hasil/Sasaran yang telah Dicapai

Hasil penelitian ini (tahun pertama) yang telah dicapai adalah kultur sel granulosa (KSG) dari folikel ovarium domba dapat digunakan sebagai media untuk pematangan (maturasi) oosit domba secara *in vitro*. Dengan demikian, temuan hasil penelitian ini adalah suatu inovasi metode maturasi oosit yang selama ini menggunakan medium artifisial yang mahal harganya menjadi KSG yang relatif murah harganya.

B. Rencana Tahapan Berikutnya

Rencana tahapan dari penelitian berikutnya (tahun kedua) adalah membuktikan bahwa KSG dari folikel ovarium domba dapat digunakan sebagai media untuk pembuahan bayi tabung (fertilisasi *in vitro*) dalam rangka alih janin (*embryo transfer*). Dengan demikian, temuan dari hasil penelitian berikutnya adalah suatu inovasi metode fertilisasi *in vitro* (FIV) yang selama ini menggunakan medium artifisial yang mahal harganya menjadi KSG yang relatif murah harganya.

Adapun gambaran skematik program penelitian ini (tahun pertama) dan penelitian berikutnya (tahun kedua) adalah sebagai berikut:



BAB VII

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat diambil suatu kesimpulan sebagai berikut: Oosit *immature* yang diaspirasi dari folikel ovarium domba dapat mengalami pematangan secara *in vitro* pada kultur sel granulosa (KSG) folikel ovarium domba berdasarkan penilaian ekspansi sel-sel kumulus. Hal ini menunjukkan bahwa KSG dapat digunakan sebagai medium untuk memelihara dan mematangkan oosit domba *immature* dengan sangat baik dibanding medium kultur (MEM).

B. Saran

Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kelayakan penggunaan kultur sel granulosa folikel ovarium sebagai medium pengembangan teknologi reproduksi seperti: IVF, cloning embryo, dan ternak transgenik.

DAFTAR PUSTAKA

- Berne, R.M. & Levy, M.N. (2000). *Principles of Physiology*. USA: Mosby, Inc.
- Chian, Ri-Cheng., Buckett, William M., Tan, Seang-Lin. (2003). Review : “*In-Vitro* Maturation of Human Oocytes”. *Reproductive BioMedicine Online*. Vol. 8. No. 2. 148-166.
- Freshney, R.I. (1990). *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*. 2nd.ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. Publication.
- Ganong, W.F. (2001). *Review of Medical Physiology*. 21st.ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Publishing Division.
- Gartner, L.P. & Hiatt, J.L. (2001). *Color text book of Histology*. 2nd.ed. USA: W.B. Saunders Company.
- Guyton, A.C. & Hall, J.E. (1996). Buku Ajar Fisiologi Kedokteran (dr. Irawati Setiawan, dkk.Terjemahan). Jakarta: EGC Penerbit Buku Kedokteran.
- Hadley, M.E. (1992). *Endocrinology*. 3rd.ed. New Jersey, USA: Prentice Hall International Inc.
- Heru Nurcahyo. (2003). Steroidogenesis, Proliferasi, dan Apoptosis Pada Kultur Sel Granulosa Berbagai Ukuran Folikel Ovarium Domba Setelah Pemberian Kurkumin Atau Pentagamavunon-0 Dengan Rangsangan FSH, LH, Dan/Atau PGF_{2α}. *Disertasi*. UGM Yogyakarta.
- Huges, P.E. & Varley, M.A. (1980). *Reproduction in The Pig*. United Kingdom: Butterworth & Co Ltd.
- Mader, S.S. (1998). *Human Biology*. 5th.ed. New York: Mc Graw Hill Comp. Inc.
- Nandi, S. et al. (2004). *In Vitro* Development of Buffalo Oocytes in Media-containing Fluids from Different Size Class Follicles. *Reprod Dom Anim* **39**, 33-38.
- Nasich M., Ciptadi G., Wahyuningsih S. (2001). Perkembangan Kumulus Oosit Komplek (COC) dan Tingkat Metafase II Oosit Kambing. *Jurnal Ilmu – Ilmu Hayat (Life Sciences)*.VOL.13 - NO.2. Hlm. 130-133.
- Primrose, S.B. (1987). *Modern Biotechnology*. London: Blackwell Scientific Publication.
- Riddle, Key. (2002). IFV: An Overview for High School Student. http://www.vetmed.auburn.edu/art/student_ivf_overview_html
- Ross, M.H., Kage, G.I., Paulina, Wojciech. (2003). *Histology: A Text & Atlas with Cell and Molecular Biology*. USA: William & Wilkins, Inc.
- Sihombing, D.T.H. (1997). *Ilmu Ternak Domba*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Susilorini T.E, Kuswati N. (2003). ”Penggunaan Serum Sapi, Cairan Folikel Dan Ekstrak Hipofise Dalam TCM-199 Untuk Maturasi Oosit Sapi”.*Jurnal Ilmu – Ilmu Hayat (Life Sciences)*.VOL. 15-NO.1. Hlm.53-58.
- Yen, S.S.C. & Jaffe, R.B. (1991). *Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathopyisiology and Clinical Management*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Yuda Heru F., Kusindarta, Dwi Liliek., Slamet Soebagyo. (2000). Penggunaan Serum Inaktivasi dari Rumah Potong Hewan pada Media Fertilisasi *In Vitro*. *Mediagama II* (2).Hlm.1-5.

PERSONALIA PENELITIAN

1. Ketua Peneliti

- a) Nama lengkap : Dr. drh. Heru Nurcahyo, M.Kes.
- b) Bidang Keahlian : Bioteknologi Hewan
- c) NIDN : 0014046205
- d) Jabatan Struktural : -
- e) Jabatan Fungsional : Lektor Kepala (750)
- f) Unit Kerja : Pendidikan Biologi, FMIPA UNY
- g) Alamat surat : FMIPA, Karangmalang, Yogyakarta, 55281
- h) Telpon/Faks : Telp. (0274)548203, Faks. (0274)548203
- i) Nomer HP : 08164226257
- j) E-mail : *h.nurcahyo@yahoo.com*

2. Anggota Peneliti

- a) Nama lengkap : Ir. Ciptono, M.P
- b) Bidang Keahlian : Embriologi Hewan
- c) NIDN : 0015116206
- d) Jabatan Struktural : -
- e) Jabatan Fungsional : Lektor (300)
- f) Unit Kerja : Pendidikan Biologi, FMIPA UNY
- g) Alamat surat : FMIPA, Karangmalang, Yogyakarta, 55281
- h) Telpon/Faks : Telp. (0274)548203, Faks. (0274)548203
- i) Nomer HP : 08122770610
- j) E-mail : *ciptono@uny.ac.id.*